Vestnik zoologii, **41**(6): 483—489, 2007
© П. Я. Килочицкий, В. Н. Мальцев, Л. З. Петрович, 2007

УДК 576.893: 195

МИКРОСПОРИДИИ (MICROSPORIDIA) РЫБ ОТРЯДА PLEURONECTIFORMES АЗОВСКОГО МОРЯ

П. Я. Килочицкий, В. Н. Мальцев, Л. З. Петрович

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01017 Украина
E-mail: zoology@biocc.univ.kiev.ua

Принято 24 апреля 2007

Микроспоридии (Microsporidia) рыб отряда Pleuronectiformes Азовского моря. Килочицкий П. Я., Мальцев В. Н., Петрович Л. З. — Проанализированы микроспоридии, выделенные из *Pleuronectes flesus luscus* Pallas и *Psetta maxima maeotica* (Pallas) Азовского моря. Обоснована гипотеза о существовании в пределах вида *Glugea stephani* (Hagenmüller, 1899) форм, рас или подвидов, отличающихся гистотропией, гостальной специфичностью, особенностями эпизоотологии и географическим распростанением.

Ключевые слова: микроспоридии, Pleuronectiformes, Азовское море.

Microsporidia (Microsporidia) of the Order Pleuronectiformes from the Sea of Azov. Kilochizkyj P. Ja., Maltsev W. N., Petrovich L. S. — The microsporidia obtained from *Pleuronectes flesus luscus* Pallas and *Psetta maxima maeotica* (Pallas) in the Sea of Azov were studied. The hypothesis about existence of certain forms, races or subspecies within the species *Glugea stephani* (Hagenmüller, 1899) differring by their hystotropia, host specificity, peculiarities of epizootology and geographical distribution is proposed.

Key words: microsporidia, Pleuronectiformes, Azov Sea.

Введение

В мировой фауне зарегистрировано 156 видов из 14 родов микроспоридий, паразитирующих у рыб (Lom, Nilsen, 2003). По количеству видов наиболее представительными являются роды *Glugea* Thelohan, 1891 (61 вид), *Pleistophora* Gurley, 1893 (44 вида) и *Loma* Morrison, Sprague, 1891 (13 видов). Несмотря на способность микроспоридий вызывать эпизоотии в популяциях различных видов рыб, изученность этих паразитов в Азово-Черноморском бассейне является наименьшей по сравнению с другими группами патогенов.

Материал и методы

В период 1986—2004 гг. было обследовано 16 видов рыб из Азовского и Черного морей. У 9 из них обнаружены микроспоридии (Мальцев, Ждамиров, 2000 а, б; Мальцев, Кілочицький, 2004; Килочицкий и др., 2005). Материалом данного исследования послужили микроспоридии, выделенные из камбалы, отловленной в Азовском море: глоссы — *Pleuronectes flesus luscus* (Pallas) и калкана — *Psetta maxima maeotica* (Pallas).

Микроспоридий изучали на светооптических препаратах: водная и тушевая суспензии; мазки, окрашенные по Романовскому-Гимза; гистологические срезы, окрашенные железным гематоксилином по Гейденгайну и гематоксилин-эозином по Эрлиху. Часть материала фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере с постфиксацией четырехокисью осмия, после чего заливали в эпоксидные смолы. Срезы, изготовленные на ультрамикротоме LKB, после контрастирования цитратом свинца по Рейнольдсу и уранилацетатом, изучали под микроскопом JEM—100. Расшифровка электронограмм проведена в Киевском национальном университете им. Тараса Шевченко.

Результаты

В печени глоссы, пораженной микроспоридиями, обнаружены овальные ксеномы размером 2—3 мм (рис. 1, B), содержащие овальные и овально-яйцевидные споры. Размеры фиксированных смесью Буэна спор 4,0 (3,75—4,38) x

2,25 (2,25—2,38) мкм. Крупная задняя вакуоль занимает около 1/2 внутреннего объема споры (рис. 2, A).

Как показал анализ электонограмм, подавляющее большинство спор оказались зрелыми. Удлиненно-овальные одноядерные споры размером 3,35—3,45 x 1,9 мкм содержат большое количество шероховатого эндоретикулума (рис. 2, A). Слабоморщинистая экзоспора толщиной 10—15 нм, эндоспора — 115—120 нм. Поляропласт наполовину представлен плотно уложенными пластинами, а вторая часть — везикулярная. Изофиллярная полярная трубка, диаметром 115—125 нм, уложена в 12,5 (10,5—13) колец. Угловатый ядерный диск располагается асим-

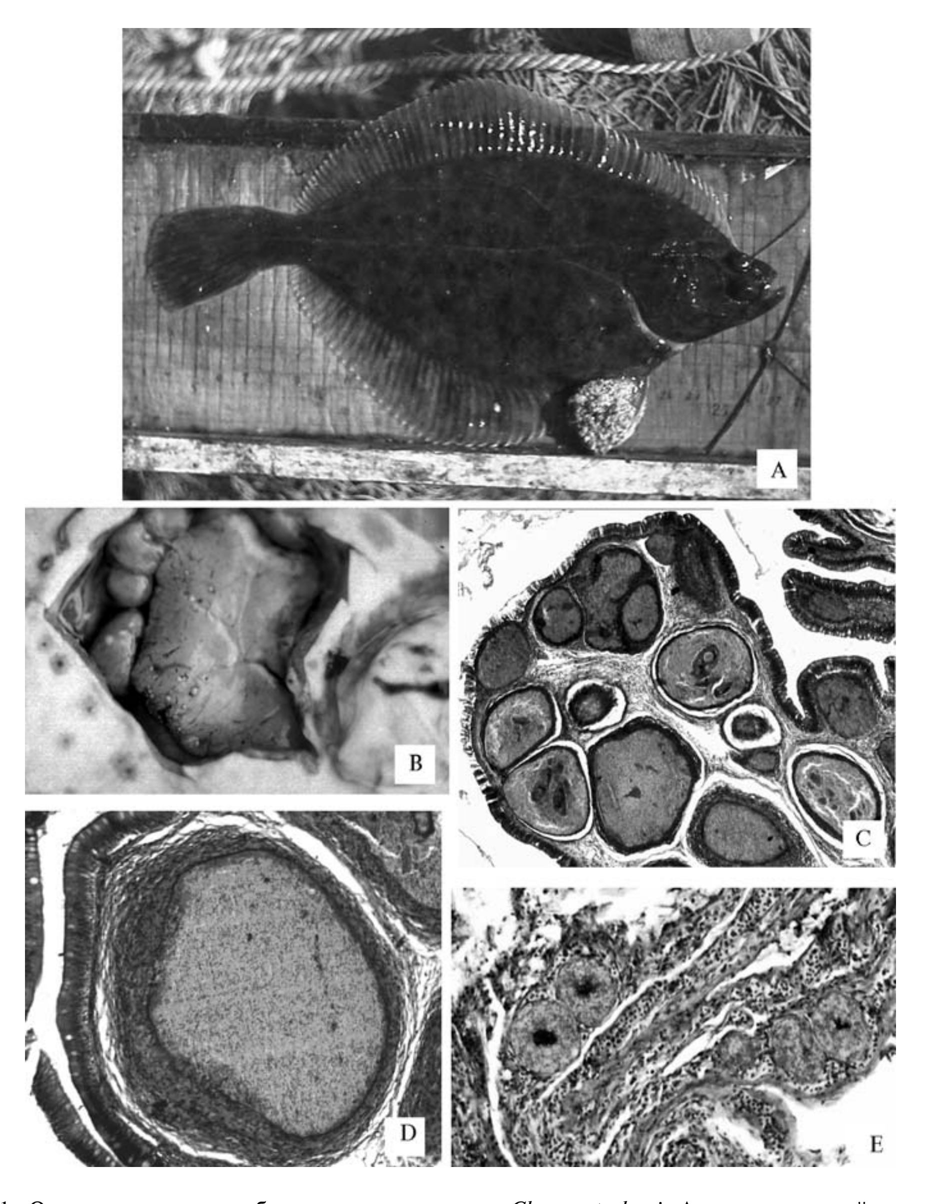


Рис. 1. Органы и ткани камбалы, инвазированные *Glugea stephani*: A — пораженный кишечник, выпавший из анального отверстия глоссы; B — печень глоссы с ксеномами; C — стенка кишечника глоссы с ксеномами, x 50; D — гистологический срез через отдельную ксеному, x 200; E — стенка кишечника калкана с ксеномами, x 80.

Fig. 1. The organs and tissues of the flounder, infected by *Glugea stephani*: A — affected intestines, which fall out from the sole anus; B — liver with xenomas; C — the intestines with xenomas, x 50; D — histological microscopic section of separate xenomy, x 200; E — part of flounder intestine with xenomas, x 80.

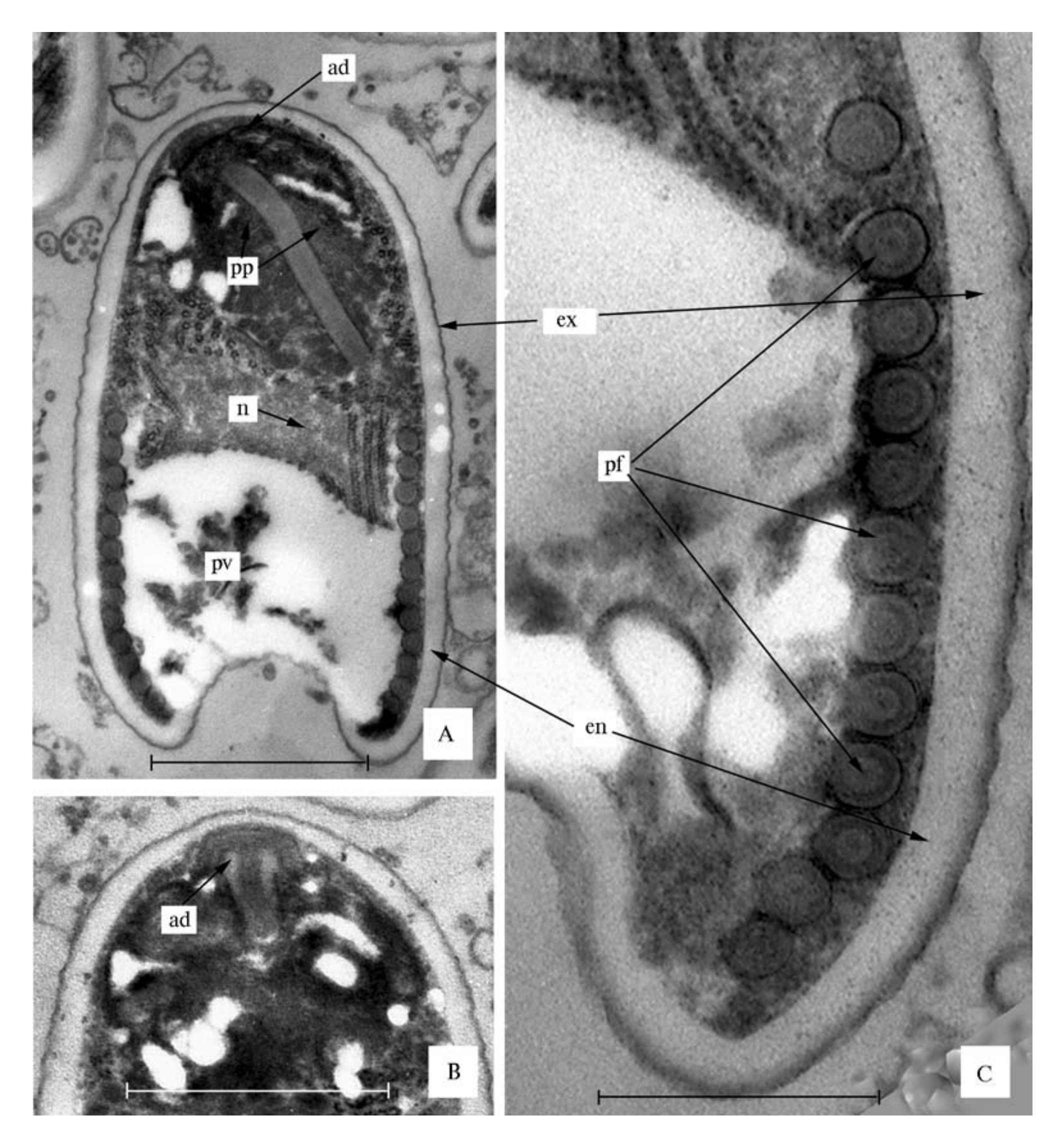


Рис. 2. Ультратонкие срезы зрелых спор *G. stephani* от *P. flesus luscus:* A – зрелая спора (масштабная линейка 0,8 мкм); B – фрагмент споры с якорным диском (масштабная линейка 1 мкм); C – фрагмент оболочки споры и полярной трубки (масштабная линейка 0,5 мкм); pv – задняя вакуоль, ex – экзоспора, en – эндоспора, pp – поляропласт, pf – полярная трубка, ad – якорный диск, n – ядро.

Fig. 2. Ultrathin sections of the mature spore *G. stephani* from the *P. flesus luscus*: A – mature spore (scale bar 0.8 mkm); B – the fragment of spore and anchoring disc (scale bar 1 mkm); C – the fragment of spore and the isofilar polar filament (scale bar 0.5 mkm); ad – anchoring disc; en – endospore; ex – exospore; n – nucleus; pf – polar filament; pp – polaroplast; pv – posterior vacuole.

метрично на переднем полюсе споры (рис. 2, B). Задняя вакуоль занимает до 45% объема споры. Задний полюс споры имеет характерную чашеобразную деформацию (рис. 2, A, C).

Многочисленные мелкие, собранные в гроздья (напоминающие цветную капусту), ксеномы (0,6–0,9 мм) в стенках кишечника самца глоссы, отловленного 9.10.97 в Сиваше, содержали овальные и овально-удлиненные споры размером 4,38–5,0 x 2,0 мкм (фиксированные смесью Буэна). Особенностью их является небольшая, до 1/5 длины споры, задняя вакуоль.

Ксеномы микроспоридии (0,4–0,9 мм), локализующиеся на внутренней поверхности жаберных крышек глоссы (отлов 4.06.98), содержали овально-яйце-

видные споры размером 4,75—5,0 х 3,0—3,75 мкм (живые) и 4,25—4,75 х 1,88—2,0 мкм (фиксация смесью Буэна). Крупная задняя вакуоль занимает более 1/2 внутреннего объема споры.

На электронограммах удлиненно-овальные споры размером 2,65—3,5 х 1,3—1,75 мкм содержат большое количество шероховатого эндоретикулума. Экзоспора толщиной 10 нм, эндоспора — 50 нм. Поляропласт представлен плотно уложенными пластинами. Изофиллярная полярная трубка диаметром 110—115 нм уложена в 12 (11,5—12) колец. Якорный диск располагается асимметрично на переднем полюсе споры. Задняя вакуоль занимает до 45% объема споры. Задний полюс споры чашеобразно вогнут.

Высокую зараженность глоссы микроспоридиями регистрировали в Сиваше в сентябре—октябре 1997 г. Ксеномы паразита находили по всей длинне кишечника рыб, а при высокой интенсивности инвазии — в печени и почках. Экстенсивность инвазии (ЭИ) составляла 90,5%, интенсивность инвазии (ИИ) — 2-N ксеном/экз., (n = 21) (у 4 рыб (19,1%) количество ксеном в кишечнике не поддавалось учету — N). В апреле 1998 г. из 11 ос. глоссы, выловленных в Обиточном заливе и Молочном лимане, 6 рыб (63,6%) были инвазированы с ИИ 2—100 ксеном/экз. В июле 1998 г. в Сиваше ЭИ глоссы составляла 83,3%, ИИ — 1-N ксеном/экз., (n = 30).

При высокой ИИ хорошо заметны признаки патологических изменений в кишечнике, печени, селезенке и гонадах рыб. Заметно меньшей была их упитанность. Встречались особи, у которых задняя кишка, сильно пораженная микроспоридиями, вываливалась через анус наружу (рис. 1, А).

В то же время, в районе Азовского передпроточья в весенний и осенний сезоны 1999 г. зараженость глоссы микроспоридиями была относительно низкой, составляя в среднем: ЭИ — 4,5%, ИИ — 1—100 (n = 76).

У половозрелого азовского калкана микроспоридии впервые были обнаружены 14.04.98 в Обиточном заливе. Сферические ксеномы (диаметром до 1 мм) в стенке кишечника (рис. 1, Е) содержали зрелые овальные споры размером 3,13 х 1,75 мкм (фиксированные смесью Буэна). В дальнейшем инвазированные микроспоридиями калканы встречались в районе Азовского передпроточья. Как правило, ксеномы паразита локализовались в стенках кишечника, реже — желудка и всегда имели небольшие (около 1 мм в диаметре) размеры. Зараженность калкана составляла: апрель—май 1999 г.: ЭИ — 18,8%, ИИ — 10—200 ксеном/экз., (n = 64); сентябрь—октябрь 1999 г. — ЭИ — 34,4%, ИИ — 6—200 ксеном/экз., (n = 32); май—июнь 2000—2001 гг. — ЭИ — 7,1%, ИИ — 1—10 ксеном/экз., (n = 14). У ювенильных особей калкана, отловленных в разные сезоны и в различных районах моря, микроспоридий не регистрировали.

Обсуждение

Принадлежность микроспоридий, обнаруженных у азовской камбалы, к роду *Glugea* не вызывает сомнений. Об этом свидетельствует наличие овальных одноядерных спор, характеризующихся: тонкой (экзоспора заметно тоньше эндоспоры) слабоволнистой, чашеобразно прогнутой на заднем полюсе оболочкой; диморфным поляропластом; изофиллярной, с эксцентрично расположенным якорным диском, полярной трубкой; крупной, около 1/2 длины споры, задней вакуолью, включающей рыхлый нитчатый и гранулярный материал. Морфометрические характеристики анализируемых нами микроспоридий близки к параметрам, соответствующим *G. stephani*, как на светооптическом (Sprague, 1977; Lom, Dykova, 1992), так и на ультрамикроскопическом (Jensen, Wellings, 1972; Takvorian, Cali, 1981) уровнях.

На сегодня у представителей Pleuronectiformes описано 6 форм микроспоридий с различными по степени валидности родовыми и видовыми статусами. В одинаковой степени подобная неопределенность характерна и для *Glugea stephani,* обнаруженной у 11 видов (без учета подвидов) камбалообразных из Средиземного, Черного, Белого, Балтийского и Северного морей бассейнов Атлантического и Северного Ледовитого океанов (табл. 1). В большинстве случаев при изучении микроспоридий использованы методы световой микроскопии.

Анализируя микроспоридии, относящиеся на сегодня к виду *G. stephani*, следует отметить наличие небольших, но существенных различий, связанных с физико-географическим распространением в пределах чрезвычайно широкого, охватывающего оба полушария, ареала и разнообразием круга хозяев. В частности, одним из признаков, используемых в диагностике микроспоридий, является детерминированность гистотропии определенных видов паразитов в

Таблица 1. Микроспоридии Камбалообразных
Table 1. Microsporidia of the Pleuronectiformes

Вид микроспоридии	Хозяин и локализация паразита	Преспоральные стадии и споры	Автор и место находки
Enterocytozoon sp. Nilsen, Ness, Nyland, 1995	*Hippoglossus hippoglossus* L., ядра лимфобластов, почки	Меронты 1-ядерные. Споры 1-ядерные, овоидные, 2,9 x 1,2 мкм; pp — пластинчатый, pt: 10—12 колец; en > ex	Nilsen et al., 1995; Норвегия
Glugea stephani (Hagenmüller, 1899) Woodcock, 1904	*Limanda limanda* (l.); *L. ferruginea* (Storer); *Liopsetta glacialis* (Pallas), *Parophris vetulus* Girard; *Platessa platessa* L.; *Platichthys stellatus* (Pallas); *Pleuronectes flesus* Pallas; *P. f. bogdanovi* Sandenberg; *P. f. trachurus* Duncker; *P. f. luscus* Pallas; *Pseudopleuronectus americanus* (Walbaum); *Rhombus maximus* (L.); кишечник, печень	Споры удлиненно-овальные, f: 3(5) x 1,5—1,75 мкм (S. & V., 1976); m: 5 x 2 мкм; pt: 12 колец (J. & W., 1972); 3 x 1,5 мкм; m: 5,1—6,2 x 2—2,5 мкм; f: 3,8—4,8 x 1,5—2 мкм; pt: 13—14 колец (T. & C., 1981)	Sprague, Vavra, 1976; Tekworian, Cali, 1981; Canning, Lom, Dykova, 1992; Франция, Англия, США, Канада; Каратаев, Исков, 1984; Овчаренко, 1990; Килочицкий и др., 2005; Черное и Азовское моря
Pleistophora hippoglossoides Bosanquet, 1910	*Hippoglossoides platessoides limandoides* (Bloch), *H. p. platessoides* (Fabr.); «узелки в мышцах», 10 x 2,5 мкм	Споронты многоядерные, споробласты — 1-ядерные. pb: 5,7—11,4 x 25,6—34,1 мкм. Споры овальные: 3,7 x 2,2 и 3,5 x 3 мкм (B., 1910); 3,7 x 2,2 мкм, pt: 7—10 колец (M. et. al., 1984)	Bosanquet, 1910; Morrison et al., 1984; Северное море; побережье США
Pleistophora sp. Woodcock, 1904	*Scophthalmus rhombus* (L.); кишечник; цисты - d = 1,5 мм	Споры — 2,5 мкм	Woodcock, 1904; США
Tetramicra brevifilum Matthews, Matthews, 1980	*Psetta maxima* (L.); соединительная ткань	—	Matthews, Matthews, 1980; Англия
Microsporidium sp. Raabe, 1935	*Pleuronectes flesus* L.; кожа	Споронты (20 x 12 мкм) дают по 2—8 спор, окруженных мембраной. Споры эллиптические, 1-ядерные, 3,3 x 2 мкм	Raabe, 1935; Англия

Условные обозначения: ex — экзоспора; en — эндоспора; f — фиксированные споры. m — живые споры; pb — панспоробласт; pp — поляропласт; pt — полярная трубка.

конкретном хозяине. Наиболее часто отмечается поражение определенных клеток (тканей) или органов. Генерализованная инвазия микроспоридиями описана лишь у членистоногих при заражении представителями рода *Nosema*.

В этом плане обращает на себя внимание политопичность локализации и различия в размерах ксеном *G. stephani* — кишечная брыжейка, стенки кишечника, жаберные крышки (относительно мелкие ксеномы) и печень (более крупные ксеномы). Возможно, это одно из свойств рода *Glugea*. Так, при инвазии представителями *Glugea* пресноводных рыб мелкие ксеномы регистрировали в кишечнике и на жаберных крышках, а крупные — в печени (Воронин и др., 1997). Следует отметить, что в некоторых случаях причиной изменения гистотропии микроспоридий может быть заражение «своего» хозяина паразитами, пассированными через неспецифического хозяина (Исси, 1986).

С другой стороны, можно допустить и возможность таксономических отличий, учитывая особенности гистотропии и размеры ксеном. Е. Каннинг с коллегами, исходя из размеров новообразований, выделили 2 группы микроспоридий: с мелкими и крупными ксеномами (Canning et al., 1986).

Заметные отличия наблюдаются в эпизоотологии *G. stephani* при поражении разных хозяев. Полевыми наблюдениями и опытным путем установлено, что заражение камбалообразных происходит скорее всего весной при температуре воды не ниже 10—15°С (Bekhti et al., 1985; Olson, 1976,1981; Takvorian, Cali, 1984). Обычная морская камбала *P. platessa* заражается перорально, без промежуточных хозяев и переносчиков. Отмечается гибель молоди рыб в первые 2 мес после заражения. С повышением температуры воды зараженность возрастает (Mc Vicar, 1975). Заражение парофриса *P. vetulus* происходит летом при температуре воды не ниже 15°С перорально или при участии ракообразных *Artemia salina* и *Corophium spinicorna*. В случае перорального заражения болезнь протекает тяжелее (Olson, 1981).

Экстенсивность инвазии резко возрастает к осени, а зимой заметно снижается (Olson, 1976; Cali, Takvorian, 1991). В то же время у западного побережья Дании наивысшую экстенсивность инвазии *P. flessus* микроспоридией *G. stephani* (5—53%) отмечали в зимнеее время (Amigo et al., 1995), что противоречит предыдущим данным. Сохранение инвазионного начала (но не развитие эпизоотического процесса) можно связать с тем, что температуры ниже 10°С, тормозя развитие, не убивают микроспоридии в течение 42 сут (Olson, 1976).

Повышению смертности молоди рыб, зараженных *G. stephani*, могут способствовать сопутствующие инфекции или инвазии, так как первичная инвазия вызывает снижение гуморальных и подавление иммунных реакций (Laudan et al., 1987).

Детальное рассмотрение обнаруженных в Азовском море микроспоридий позволяет отметить у них наличие признаков, свидетельствующих в пользу их неоднородности. Это, прежде всего, обилие в спорах шероховатого эндоретикулюма, что отличает их от известных описаний. Споры микроспоридий, поражающих печень, кроме крупных ксеном имеют более толстую оболочку (125—135 нм) по сравнению со спорами из жаберных крышек (60 нм) и несколько более длинную полярную трубку. Эти отличия могут быть или следствием различной гистотропии, или иметь таксономическое значение.

Исходя из морфологической вариабельности, особеностей эпизоотического процесса и учитывая географическое распространение, хозяев можно предположить существование нескольких тканевых форм, географических рас или подвидов *G. stephani,* поражающих разные ткани и органы хозяев или разные виды хозяев в разных биогеоценозах.

Окончательный вывод о таксономической значимости отличительных признаков этих форм микроспоридий возможен только после специальных исследований.

Газимагомедов А. А., Исси И. В. Микроспоридии — паразиты рыб Каспийского моря // Зоол. журн. — 1970. — **49**, вып. 8. — С. 1117—1125.

Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Протозоология. — 1986. — **10**. — С. 6—136.

Килочицкий П. Я., Мальцев В. Н., Петрович Л. З. Светооптический анализ микроспоридий рыб Азовского моря // Вестн. зоологии. — 2005. — Suppl. № 19. — С. 170—172.

Мальцев В. М., Кілочицький П. Я. Про зараження мікроспоридіями (Protozoa, Microsporidia) промислових риб Азовського і Чорного морів // Сучасні проблеми зоологічної науки : Матеріали Всеукр. наук. конф. (16—18 вер. 2004 р., Київ ; Канів). — К. : ВПЦ Київський ун-т, 2004. — С. 108—110.

Мальцев В. Н., Ждамиров В. Н. Некоторые паразитологические аспекты культивирования азовского калкана // Водные биоресурсы и пути их устойчивого использования : Материалы Междунар. науч. конф. (31 янв.—1 февр. 2000 г., Киев). — Киев, 2000 а. — С. 85—88.

Мальцев В. Н., Ждамиров В. Н. Зараженность паразитами и ихтиопатологическое состояние промысловых рыб Азовского моря // Понт-Эвксинский : Тез. докл. Конф. молодых ученых (18—19 мая 2000 г., Севастополь). — Севастополь, 2000 б. — С. 85—88.

Найденова Н. Н., Шульман С. С., Донец З. С. Микроспоридии. Определитель паразитов позвоночных Черного и Азовского морей. — Киев : Наук. думка, 1975. — С. 50—52.

Овчаренко Н. А. К фауне и экологии микроспоридий рыб сем. Gobiidae низовья Днепра, Днепро-Бугского и Березанского лиманов // Гидробиол. журн. — 1985. — **21**, № 4. — С. 103—108.

Овчаренко Н. А. Микроспоридии рыб и кормовых водных беспозвоночных дельты Днепра, Днепровско-Бугского и Березанского лиманов : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — 1990. — 17 с.

Amigo J. M., Gracia M. P., Salvado H. et al. Seasonal evolution of Glugea stephani (Protozoa: Microspora) parasitic of flounders Platichthys flessus, from the western coastes of Denmark // Eur. J. Protistol : 2nd Eur. Congr. Protistol. and 8th Eur. Conf. Ciliate Biol. (Clermont-Ferrand, Juli 21—26, 1995). — 1995. — **31**, N 4. — P. 402.

Bekhti M., Vianet R., Bouix O. Glugea stephani (Hagenmüller, 1899) Microsporidie parasite du flet Platichthys flessus (Linne, 1758) du littoral languedocien. Importance du regime alimentaire de l'hфte dans le cycle saisonnier du parasite // Uie et milieu. — 1985. — **35**, N 2. — P. 107—114.

Berrebi P. Etude ultrastructurale de Glugea atherinae n. sp., microsporidie parasite de l'atherine Atherina boueri Risso 1810 (poisson teleosteen) dans les Lagunes du Languedoc et de Provence // Z. Parasitenk. — 1979. — **60**, N 2. — P. 105—122.

Cali A., Tekvorian P. M. The incidence of Glugea stephani (Protozoa: Microsporida) in winter flounder Pseudopleuronectes americanus from the New-York-New Jersey Lower Bay complex and factors influencing it // Can. J. Zool. — 1991. — **69**, N 2. — P. 317—321.

Canning E. U., Lom J., Dykova I. The Microsporidia of Vertebrates. — Academic Press, 1986. — 241 p.

Laudan R., Stolen J. S., Cali A. The immunomodulating effect of the microsporidan Glugea stephani on the humoral response and immunoglobulin lewels in winter flounder, Pseudopleuronectes americanus // J. Fish Biol. — 1987. — **31**, Suppl. A. — P. 155—160.

Lom J., Dykova I. Protozoan parasites of Fish. — Elsvier Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992. — 315 p.

Lom J., Nilsen F. Fish microsporidia: fine structurae diversity and phylogeny // Intern. J. for Parasitology. — 2003. — **33**. — P. 107—127.

Mc Vicar A. H. Infection of plaice Pleuronectes platessa L. with Glugea (Nosema) stephani (Hagenmüller, 1899) (Protozoa: Microsporidia) in a fish farm and under experimental conditions // J. Fish Biol. — 1975. — **7**, N 5. — P. 611—619.

Olson R. E. Laboratory and field studies on Glugea stephani (Hagenmüller), a microsporidan parasite of pleuronectid flatfishes // J. Protozool. — 1976. — **23**, N 1. — P. 158—164.

Olson R. E. Effects of low temperature on the development of the microsporidan Glugea stephani in english sole (Parophrys vetulus) // J. Wildlife Diseases. — 1981. — **17**, N 4. — P. 559—562.

Sprague V. Systematics of the Microsporidia // Compar. Pathobiology. — New York, 1977. — **2**. — 510 p.

Takvorian P. M., Cali A. The occurrence of Glugea stephani (Hagenmüller, 1899) in american winter flounder, Pseudopleuronectes americanus (Walbaum) from the New York-New Jersey lower bay complex // J. Fish Biol. — 1981. — **18**, N 4. — P. 491—501.

Takvorian P. M., Cali A. Seasonal prevalence of the microsporidan, Glugea stephani (Hagenmüller, 1899) in winter flounder, Pseudopleuronectes americanus (Walbaum), from the New York-New Jersey lower bay complex // J. Fish Biol. — 1984. — **24**, N 6. — P. 655—663.